

“黄枇杷烟”吸入抑制肺癌小鼠肿瘤生长及其对 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达的影响

史国军 邵树巍 山广志 施航 叶兴涛 陆宁 董晶

(宁波市中医院肿瘤科,浙江宁波 315010)

摘要 目的:观察“黄枇杷烟”吸入对肺癌小鼠抑瘤率、去氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白及其上游基因 mRNA 表达的影响。方法:建立小鼠肺癌模型,随机分为模型组、顺铂组和黄枇杷烟低、高剂量组,每组 10 只,各组分别予相应药物或生理盐水雾化。治疗后计算各组抑瘤率,免疫印迹法(Western blotting)检测肿瘤组织 HIF-1 α 、VEGF 的表达,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测上游基因 mRNA 表达。结果:黄枇杷烟低、高剂量组和顺铂组小鼠瘤重明显低于模型组($P<0.05$, $P<0.01$),顺铂组小鼠瘤重明显低于黄枇杷烟低、高剂量组。与模型组比较,黄枇杷烟高剂量组和顺铂组小鼠肿瘤组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白及其上游基因 mRNA 的表达均明显降低,以顺铂组作用最明显。结论:“黄枇杷烟”吸入可抑制肺癌小鼠肿瘤生长,其作用机制可能为下调 HIF-1 α 、VEGF 蛋白及其上游基因 mRNA 的表达,继而抑制肿瘤血管生成而发挥抗肿瘤效应。

关键词 肺肿瘤 去氧诱导因子-1 α 血管内皮生长因子 实验研究 雄黄 枇杷叶 烟雾吸入
中图分类号 R734.2 文献标志码 A 文章编号 1672-397X(2017)07-0073-03

随着工业化进程的发展,全世界肺癌的发病率和死亡率明显升高^[1],每年约有 120 万新增病例。大多数肺癌患者确诊时已属晚期,高龄老年患者尤其不能耐受手术和放化疗,生存质量差。近年来,受靶向学说的启示,我科设计了“黄枇杷烟”吸入法治疗肺癌,黄枇杷烟由雄黄、枇杷叶组成,前期临床研究显示,黄枇杷烟吸入可抑制肿瘤生长,提高机体免疫力,改善患者的微循环,在治疗肺癌方面取得了较好的疗效^[2-3]。本研究建立小鼠肺癌模型,探讨“黄枇杷烟”抑制肺癌小鼠肿瘤的作用机制。

1 实验材料

1.1 细胞株与实验动物 小鼠 Lewis 肺癌细胞株购自中国科学院细胞库。C57/BL6 雄性小鼠 60 只,SPF 级,4~5 周龄,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物许可证号:SCXK(沪)2013-0016,饲养于浙江省医学科学院实验动物中心。

1.2 药物与仪器 黄枇杷烟制作方法:选用明雄黄、枇杷叶,雄黄碾粉后过 80 目筛,枇杷叶烤干,切成烟丝状,使用时雄黄和枇杷叶按一定比例配制。黄枇杷烟高剂量:雄黄 0.1g,枇杷叶 2g;黄枇杷烟低剂量:雄黄 0.05g,枇杷叶 2g。顺铂注射液(DDP):30mg/10mL,上海旭东海普药业有限公司(批号:FA130316)。VEGF

抗体:购自 Santa 公司(批号:G0815)。HIF-1 α 抗体:购自 CST 公司(批号:H2003)。ECL 发光试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5 \times)、Western 及 IP 细胞裂解液、PMSF、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天公司。高纯总 RNA 快速提取试剂 TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司(批号:66006),反转录试剂盒购自 Roche 公司(批号:14272020),PCR 试剂购自 Roche 公司(批号:14382900)。欧姆龙压缩式雾化器:NE-025S,购自中山市全康医疗科技有限公司。自制烟气吸入玻璃密闭仪。台式高速离心机:MicroCL 17R,购自 Thermo Scientific 公司。

2 实验方法

2.1 造模与分组 采用 Lewis 肺癌移植瘤模型^[4]。-100 $^{\circ}$ C 液氮保存的 Lewis 瘤株,于 37 $^{\circ}$ C 水浴中复苏,接种于 C57/BL6 小鼠腹腔,9d 后,无菌条件下操作,取荷瘤小鼠腹水,洗涤调整细胞浓度约 2×10^6 个/mL 的细胞悬液,台盼蓝染色观察活细胞数(>95%),在小鼠右腋窝皮下接种瘤细胞 0.2mL,5d 后,待移植瘤长至直径 0.3~0.5cm,剔除瘤块未生成的和过大的移植瘤小鼠模型。将造模成功的 40 只小鼠随机分为模型组、顺铂组和黄枇杷烟低、高剂量组,每组 10 只。

基金项目:国家中医药管理局“十二五”重点专科建设项目(国中医药医政发[2012]2号);宁波市医学科技计划项目(2013A20)

2.2 给药方法

2.2.1 雾化吸入 顺铂组：将小鼠放置于泡沫箱内，并全部放于生物安全柜。雾化器喷嘴用保鲜膜固定于箱口一边，做简单封闭。10只小鼠每只体重约20g，每周连续雾化3d，每日雾化顺铂1mg/kg，共2周。模型组：将小鼠放置于同样大小泡沫箱内，每日雾化等量生理盐水，每周连续雾化3d，共2周。

2.2.2 黄枇杷烟吸入 黄枇杷烟低、高剂量组小鼠连同鼠笼一起放入自制烟气吸入玻璃密闭仪里，将不同比例雄黄和枇杷叶混匀放置于石棉网上，酒精灯点燃，产生烟雾，由燃烧产生烟雾过程共15min左右，在仪器内烟熏放置20min，每日1次，持续2周。

2.3 观察指标和方法

2.3.1 各组小鼠瘤重测定和抑瘤率计算 于治疗2周后断颈处死小鼠，剥离附着肿瘤体上的结缔组织后留取瘤组织，予以称重备用并计算抑瘤率^[5]。公式：抑瘤率(%)=(对照组的平均瘤重-用药组的平均瘤重)/对照组的平均瘤重×100%。

2.3.2 Western blotting 检测肿瘤组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白的表达 标本取材后，蛋白提取，BCA法测定蛋白浓度，聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜，封闭，孵育一抗、二抗，化学发光显影，以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参照，Kodak Image Station 2000MM 成像系统采集图像，用图像处理软件 Image Tool 3.0 分析各蛋白条带的灰度值，将待测蛋白的灰度值与内参灰度值作比较，获得 HIF-1 α 、VEGF 的相对灰度比值，即相对蛋白表达量。

2.3.3 RT-PCR 法检测肿瘤组织 HIF-1 α mRNA、VEGF mRNA 表达 样本处理后，提取总 RNA，反转录获得 cDNA，以 cDNA 为模板，利用 DNA 聚合酶进行 Real Time PCR 扩增实验。结果的数值(即拷贝数)分析，用拷贝数/ μ L cDNA 表示。考虑到各个样本总 RNA 浓度的差异，以 HIF-1 α /GAPDH 或 VEGF/GAPDH 的比值作为统计对象，比较各组差异。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件统计数据，实验结果计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示，采用单因素方差分析，多组间两两比较用 LSD 法，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组小鼠瘤重及抑瘤率比较 与模型组比较，黄枇杷烟低、高剂量组和顺铂组小鼠平均瘤重均明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。黄枇杷烟低、高剂量组及顺铂组对肺癌小鼠的肿瘤生长都有抑制作用，以顺

铂组抑瘤率最明显，黄枇杷烟高、低剂量组次之。见表1。

表1 各组小鼠瘤重及抑瘤率比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	瘤重(g)	抑瘤率(%)
模型组	10	1.92±0.42	
顺铂组	10	1.07±0.31**	45.53
黄枇杷烟低剂量组	10	1.43±0.38*#	24.56
黄枇杷烟高剂量组	10	1.33±0.38*#	28.34

注：与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与顺铂组比较，# $P<0.05$ 。

3.2 各组小鼠肿瘤组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达比较 与模型组比较，黄枇杷烟高剂量组和顺铂组小鼠肿瘤组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)；黄枇杷烟高、低剂量组小鼠肿瘤组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达明显高于顺铂组($P<0.05$, $P<0.01$)。表明黄枇杷烟高剂量组能降低肺癌小鼠肿瘤组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达，但不及顺铂组，而黄枇杷烟低剂量吸入对上述蛋白表达无影响。结果见表2、图1。

表2 各组小鼠肿瘤组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达的灰度比值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	HIF-1 α	VEGF
模型组	10	0.59±0.18	0.58±0.09
顺铂组	10	0.30±0.06**	0.36±0.09**
黄枇杷烟低剂量组	10	0.55±0.13##	0.51±0.12##
黄枇杷烟高剂量组	10	0.44±0.11*#	0.47±0.06*#

注：与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与顺铂组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

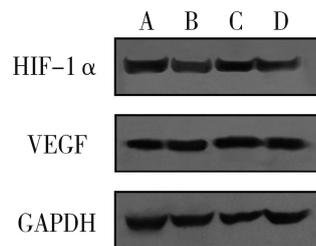


图1 各组小鼠 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达 Western Blotting 电泳图
注：A.模型组；B.顺铂组；C.黄枇杷烟低剂量组；D.黄枇杷烟高剂量组

3.3 各组小鼠肿瘤组织 HIF-1 α mRNA、VEGF mRNA 表达比较 与模型组比较，黄枇杷烟高剂量组和顺铂组小鼠肿瘤组织 HIF-1 α mRNA、VEGF mRNA 表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)；黄枇杷烟高、低剂量组小鼠肿瘤组织 HIF-1 α mRNA、VEGF mRNA 表达明显高于顺铂组($P<0.05$, $P<0.01$)。表明黄枇杷烟高剂量吸入能明显降低肺癌小鼠肿瘤组织 HIF-1 α mRNA、VEGF mRNA 表达，但不及顺铂组，而黄枇杷烟低剂量吸入则对上述蛋白上游基因 mRNA 表达无影响。结果见表3。

表3 各组小鼠肿瘤组织 HIF-1 α mRNA、VEGF mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	HIF-1 α	VEGF
模型组	10	0.88 \pm 0.09	0.82 \pm 0.12
顺铂组	10	0.55 \pm 0.13**	0.56 \pm 0.10**
黄枇烟低剂量组	10	0.81 \pm 0.08##	0.76 \pm 0.12##
黄枇烟高剂量组	10	0.77 \pm 0.08###	0.68 \pm 0.11**

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与顺铂组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

4 讨论

研究证实,缺氧是实质性肿瘤物理微环境的基本特征之一^[6]。恶性肿瘤在生长过程中,组织增生过快导致局部严重缺氧,HIF-1 α 是介导肿瘤缺氧适应性反应的关键转录因子,它激活后可调节下游多种基因的表达,对维持肿瘤细胞能量代谢,新生血管形成,促进肿瘤侵袭和转移起重要作用^[7]。在恶性肿瘤发生侵袭转移的多个环节中,血管生成自始至终发挥着重要作用^[8]。VEGF是目前所知的作用最强的血管生长因子,而HIF-1 α 可在基因水平上直接调控VEGF的表达,是HIF-1 α 重要的靶基因之一。因此通过抑制HIF-1 α 的活性而抑制VEGF,从而抑制肿瘤血管生成,是肿瘤治疗的重要手段。

雄黄又名黄金石、石黄、鸡冠石,始载于《神农本草经》,性温,味辛、苦,有毒,入心、肝二经,主要功效是燥湿、祛风、解毒、杀虫。2005年版《中华人民共和国药典》^[9]记载:雄黄为硫化物类矿物,主含二硫化二砷(As₂S₂)和四硫化四砷(As₄S₄),并夹杂少量三氧化二砷(As₂O₃)和其他重金属盐。雄黄抗肿瘤作用机制包括抑制肿瘤细胞增殖,诱导凋亡或促进分化等^[10]。雄黄经过加热或燃烧会产生As₂O₃(俗称砒霜)和As₂O₂^[11],而As₂O₃是中西医学者公认的具有抗癌作用的药物,其抗肿瘤作用涉及抗肿瘤血管生成,诱导细胞分化与凋亡,细胞周期阻滞及调节多种基因表达^[12]。As₂O₃静脉制剂-亚砷酸注射液已广泛应用于临床治疗多种恶性血液病,如白血病、骨髓瘤、骨髓增生异常综合征等,并已获得全世界的公认^[13]。枇杷叶性微寒,味苦、微辛,归肺、胃经,具有清肺止咳、降逆止呕功效。现代药理学研究表明,枇杷叶中乌索酸是一种很强的血管生成抑制剂,能抑制血管内皮细胞的增殖、迁移及小管形成等^[14]。

近年来开展的局部治疗如介入和吸入化疗药物^[15],启示我们可通过肺部吸入药物治疗肿瘤,提高肿瘤局部药物浓度,在治疗的同时避免其副作用,以期达到抑瘤的目的。本研究结果表明,黄枇烟低、高剂量吸入和顺铂雾化均能抑制肿瘤细胞增殖,黄枇烟高剂量吸入和顺铂雾化可明显降低肺癌

小鼠肿瘤组织HIF-1 α 和VEGF蛋白及其mRNA表达,说明黄枇烟吸入可能通过降低肿瘤组织HIF-1 α 、VEGF表达,抑制肿瘤血管生成,从而达到抑制肿瘤生长的效果。同时研究结果也发现,HIF-1 α 的表达同VEGF表达呈相关性。此研究结果为进一步展开黄枇烟抗肿瘤研究奠定了基础。下一步课题组拟深入研究黄枇烟通过何种机制影响HIF-1 α 、VEGF表达,从而为黄枇烟临床应用提供实验依据。

参考文献

- [1] 杨德昌,杨拴盈.肺癌诊断及治疗进展[J].中华结核和呼吸杂志,2004,27(1):18.
- [2] 山广志,王海涛.黄枇烟吸入法治疗肺癌临床观察[J].中国中医药信息杂志,2011,18(8):77.
- [3] 史国军,山广志.黄枇烟对肺癌患者免疫功能、血液流变学及凝血功能变化的影响[J].中国中医药科技,2013,20(2):115.
- [4] 梁靓靓,陈苏宁,蔡玉文.调气消积汤对Lewis肺癌移植瘤血管生成影响的实验研究[J].中国中医药科技,2011,18(4):284.
- [5] 刘晓宇.半边莲煎剂对肝癌H22荷瘤小鼠的抑瘤作用及对P27、Bcl-2及Survivin表达的影响[D].大连:大连医科大学,2010.
- [6] MARX J.How cells endure low oxygen[J].Science,2004,303(5663):1454.
- [7] 高洁,代志军,王西京,等.缺氧诱导因子-1与肿瘤发生发展的关系[J].现代肿瘤医学,2007,15(2):273.
- [8] 谭树芬,卢玉波.血管生成因子与肿瘤生长的相互关系[J].微循环学杂志,2007,17(4):64.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].2005版.北京:化学工业出版社,2005:236.
- [10] 林梅,裴军昌,张东生,等.雄黄抗癌作用的研究进展[J].中国实用医药,2007,2(13):1.
- [11] 潘雪英.探讨温度对雄黄中三氧化二砷含量的影响[J].中国药师,2005,8(9):797.
- [12] 郝杰,刘云鹏.三氧化二砷抗肿瘤临床应用进展[J].国外医学(肿瘤学分册),2004,31(2):122.
- [13] 姚瑞东.中成药的合理应用[J].中国实用医药,2012,7(34):147.
- [14] ITO H,KOBAYASHI E,TAKAMATSU Y.Effect of on blood glucose levels of normal and alloxan-diabetic rabbits[J].Chem Pharm Bull,2000,48(5):687.
- [15] 华新民,刘建阳,王启文.高频加氧雾化吸入顺铂法治疗肺癌的临床及药代动力学研究[J].癌症,2000,19(4):378.

第一作者:史国军(1978—),男,医学博士,副主任中医师,从事中西医结合防治肿瘤的临床与基础研究。sgj307@163.com

收稿日期:2017-03-30

编辑:吴宁